

## Voordrachten

# De ontrafeling van de genetische achtergrond van erfelijke ongeconjugeerde hyperbilirubinemie

P.J. BOSMA, C.T.M. BAKKER en F.J. HOEK

Dit overzicht beschrijft de ontwikkeling in het onderzoek naar erfelijke hyperbilirubinemie van de laatste 4 jaar waaraan ons laboratorium een belangrijke bijdrage heeft geleverd. Het gen betrokken bij deze erfelijke afwijking is in deze periode geïsoleerd en een groot aantal mutaties die tot erfelijke hyperbilirubinemie leiden zijn geïdentificeerd. De verkregen kennis wordt gebruikt voor diagnostiek en zal in de toekomst mogelijk leiden tot de ontwikkeling van genterapie.

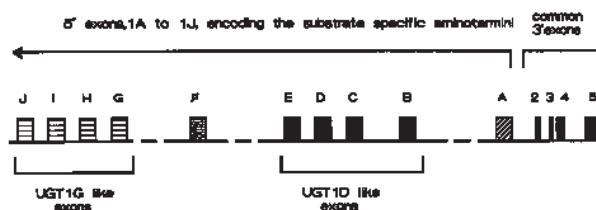
Een essentiële stap in de uitscheiding van een groot aantal hydrofobe endogene en exogene substraten is de door uridine-difosfaat-glucuronosyltransferase (UGT) gekatalyseerde glucuronidering. In deze reactie worden de hydrofobe substraten omgezet in hydrofiele substraten door covalente binding aan UDP-glucuronzuur (UDPGA). De UGTs vormen een multi gen familie van membraan gebonden enzymen die gelokaliseerd zijn in het endoplasmatisch reticulum (ER). Fysiologisch gezien is de glucuronidering van het endogene substraat bilirubine van groot belang. Dit giftige substraat wordt iedere dag in grote hoeveelheden geproduceerd. Deficiënte glucuronidering van bilirubine leidt tot de stapeling van bilirubine. De hoge bilirubine niveau's in serum kunnen tot vergiftiging leiden zoals in Crigler-Najjar syndroom. In de mens is er slechts één glucuronosyltransferase dat bilirubine herkent, het bilirubine UGT. Dit B-UGT en een aantal andere glucuronosyltransferases worden gecodeerd door het UGT1 gen. Alle door UGT1 gecodeerde transferases hebben ieder een unieke aminoterminus, die de substraat bindingsplaats bevat. De voor alle UGT1 enzymen identieke carboxyterminus bevat de UDPGA bindingsplaats en het ER retentie signaal. Sinds de isolatie van het UGT1 gen zijn een groot aantal mutaties bij Crigler-Najjar patiënten opgespoord. Recentelijk hebben wij de genetische achtergrond van milde erfelijke hyperbilirubinemie opgehelderd. Deze veel voorkomende afwijking wordt veroorzaakt door een extra TA in het promoter ge-

bied van B-UGT, die de expressie van B-UGT tot 20% van normaal verlaagt. Deze verlaagde expressie is een voorwaarde voor Gilbert syndroom maar voor klinische presentatie is een additionele factor nodig.

*Trefwoorden: bilirubine, glucuronosyltransferase, mutatie-analyse, Crigler-Najjar, Syndroom van Gilbert*

### De UDP-glucuronosyltransferase multi gen familie

De UDP-glucuronosyltransferases (UGT's; EC2.4.1.17) katalyseren de koppeling van een groot aantal verschillende hydrofobe substraten aan glucuronzuur (UDPGA). Deze glucuronidering is een essentiële stap in de detoxificatie van veel endogene substraten, zoals steroidhormonen en bilirubine, en exogene stoffen, waaronder voedsel-additieven en medicijnen (1,2). Door deze biotransformatie worden de hydrofobe stoffen wateroplosbaar zodat ze via de gal en/of de urine uitgescheiden kunnen worden. In de glucuronidering speelt de lever een belangrijke rol, maar ook in de nieren en in de darm vindt glucuronidering plaats. De membraan gebonden UDP-glucuronosyltransferases zijn gelokaliseerd in het endoplasmatisch reticulum. Iedere glucuronosyltransferase heeft een eigen substraatspecificiteit die wel gedeeltelijk overlapt met die van andere. Een aantal humane lever cDNAs coderend voor glucuronosyltransferases zijn gekloneerd. Op basis van overeenkomst in aminozuurvolgorde worden de tot nu toe bekende UGT's in twee subfamilies ingedeeld (3). De leden van de UGT2-subfamilie worden gecodeerd door verschillende op chromosoom 4 gelegen genen. Op aminozuur niveau zijn de glucuronosyltransferases van



**Figuur 1.** Schema van het humane UGT1-gen. Door middel van alternatieve splicing codeert dit gen voor 10 verschillende mRNA's. De 5'-gelegen exonen UGT1A tot en met UGT1F coderen voor de substraatspecificiteit. Exon UGT1A codeert voor het bilirubine glucuronosyltransferase. Het door UGT1D gecodeerde UGT is hier sterk homolog aan het bilirubine UGT. UGT1F en UGT1G coderen voor twee phenol-UGTs. De gemeenschappelijke 3'-exonen coderen voor de UDPGA-bindings plaats en het membraan gebonden deel.

*Afdelingen Maag, Darm en Leverziekten en Klinische Chemie, Academisch Medisch Centrum, Amsterdam*

Naar een voordracht, tijdens het 47e congres NVKC, bij het behalen van de Ortho Prijs 1994.

Correspondentie: Dr. P. J. Bosma, Afdelingen Maag, Darm en Leverziekten en Klinische Chemie, Meibergdreef 9, 1105 AZ Amsterdam.

Ingekomen: 24.08.95

deze subfamilie voor 60 tot 90 procent homoloog. Ook een aantal UGT's van de rat die behoren tot de UGT2-familie zijn gekloneerd en zijn sterk homoloog met de humane UGT2's. Al deze UGT2-enzymen zijn betrokken bij de glucuronidering van diverse steroidhormonen (4-9).

In tegenstelling tot de UGT2-subfamilie worden alle leden van de UGT1-subfamilie gecodeerd door één op chromosoom 2 gelegen gen, het UGT1-gen (10-13). Door middel van alternatieve splicing worden van dit UGT1-gen tenminste 10 mRNA's afgeschreven (zie figuur 1), die ieder coderen voor één UDP-glucuronosyltransferase. De amino-einden van de verschillende UGT1-enzymen zijn uniek voor ieder enzym. Dit deel van het enzym bevat de substraatbindingsplaats (14). De verschillende amino-einden worden gecodeerd door een serie van 5'-gelegen exonen, exon UGT1.A tot UGT1.J. Op aminozuur niveau is de homologie tussen deze amino-einden 60 tot 70 procent (13). In tegenstelling tot het amino-einde is het carboxy-einde van alle door het UGT1-gen gecodeerde enzymen identiek. Dit deel van het eiwit bevat onder andere de bindingsplaats voor het co-substraat UDPGA (13) en het signaal dat zorgt voor retentie in het endoplasmatisch reticulum (15). De vier 3'-gelegen exonen, UGT1.2 tot en met UGT1.5 coderen voor dit gemeenschappelijke carboxydeel. De glucuronosyltransferase waarvan het amino-einde door exon UGT1A gecodeerd wordt, is in een apeniercellijn tot expressie gebracht en bleek in staat bilirubine te glucuronideren. Naast deze bilirubine glucuronosyltransferases zijn drie andere cDNA's van deze subfamilie tot expressie gebracht. De glucuronosyltransferase, die het door UGT1.D gecodeerde amino-einde bevat, zou volgens Ritter et al. ook in staat zijn bilirubine te glucuronideren (10). Om het belang van deze twee glucuronosyltransferases voor de glucuronidering van bilirubine te bepalen, hebben wij beide en hun specifieke bilirubine-glucuroniderende activiteit met elkaar vergeleken. Hieruit bleek dat de bilirubine-glucuroniderende activiteit van het door UGT1.D gecodeerde enzym verwaarloosbaar laag is (16). Bovendien is de expressie van deze vorm ook veel lager dan die van de door UGT1.A gecodeerde vorm. Dit betekent dat in de mens alleen het door UGT1A gecodeerde  $\beta$ -UGT fysiologisch relevant is voor de glucuronidering van bilirubine. Beide UGT1-enzymen waarvan de amino-einden gecodeerd worden door exonen UGT1.H en UGT1.G zijn ook tot expressie gebracht. De substraatspecificiteit van deze twee enzymen overlapt gedeeltelijk. Beide spelen een rol in de glucuronidering van fenolen (17,18), waarbij UGT1G een hoge affiniteit voor "vlakke" fenolen heeft terwijl UGT1H hoge affiniteit heeft voor "ruimtelijke" fenolen. De substraten van de andere door het UGT1 gen gecodeerde glucuronosyltransferases zijn onbekend. Niet alle mRNA's die van dit gen worden afgeschreven coderen voor een functioneel eiwit. Zo bevat exon UGT1.B een stop codon waardoor dit exon voor een sterk verkort en dus inactief enzym codeert (11).

### Metabolisme van bilirubine

De glucuronidering van bilirubine is fysiologisch van

groot belang. Per dag komt door afbraak van haem 3,8 mg bilirubine per kg lichaamsgewicht vrij. Het grootste deel hiervan wordt in de milt geproduceerd. Bilirubine wordt aan albumine gebonden, door het bloed naar de lever getransporteerd en wordt daar door de hepatocyten opgenomen. In de lever wordt het bilirubine geglucuronideerd en via de gal uitgescheiden. Deficiëntie van bilirubine-glucuronidering leidt tot stapeling van ongeconjugerd bilirubine. Bij serum niveau's hoger dan 450  $\mu\text{mol/l}$  bij volwassenen of 340  $\mu\text{mol/l}$  bij pasgeborenen, veroorzaakt ongeconjugerd bilirubine encephalopathie en kernicterus. Dit kan optreden in te vroeg geboren kinderen en in pasgeborenen met hemolyse (19,20). Ook bij patiënten met het syndroom van Crigler-Najjar, die lijden aan een erfelijke deficiëntie van bilirubine-glucuronideringsactiviteit, treedt stapeling van ongeconjugerd bilirubine op. Bij deze patiënten kunnen de hoge bilirubineniveau's in serum ernstige gevolgen hebben (21).

### Bilirubine UDP-glucuronosyltransferase deficiënties

Crigler-Najjar syndroom is een zeldzame recessieve erfelijke afwijking met een incidentie van 1 op  $10^6$  geboortes. Van deze bilirubine-deficiëntie bestaan twee vormen, type 1 en type 2.

#### *Crigler-Najjar Type 1 (21,22)*

Bij patiënten die lijden aan deze afwijking, de meest ernstige, is geen bilirubine-UGT-activiteit aanwezig. Hierdoor stijgt het ongeconjugeerde bilirubine niveau in serum tot boven 400  $\mu\text{mol/l}$ . Zonder behandeling leidt deze afwijking tot hersenbeschadigingen en is uiteindelijk lethaal. De enige afdoende behandeling voor Crigler-Najjar type 1 is een levertransplantatie. Een alternatieve behandeling is lichttherapie (23,24). In ongeconjugerd bilirubine worden de aanwezige polaire groepen normaliter afgeschermd. Door blootstelling aan UV licht wordt bilirubine aangeslagen en worden deze groepen geëxposeerd. Hierdoor is dit aangeslagen ongeconjugeerde bilirubine water oplosbaar en wordt het via gal en urine uitgescheiden. Om het bilirubine in serum onder een niveau te houden waarbij schade optreedt, moeten type 1 patiënten per dag 10 tot 12 uur over hun hele lichaam bestraald worden met sterk UV licht. Of deze behandeling schadelijke bijwerkingen heeft is vanwege het kleine aantal behandelde patiënten nog onzeker. Tot nu toe is er nog geen geval van huidkanker bij de behandelde patiënten geconstateerd. Wel wordt deze behandeling na verloop van tijd minder effectief. Dit wordt veroorzaakt door het dikker worden van de huid en/of de afname van huidoppervlak per kg lichaamsgewicht (25,26).

#### *Crigler-Najjar Type 2 (27)*

Bij deze patiënten is nog enige bilirubine-UGT-activiteit aanwezig. Hierdoor blijven de bilirubine-niveau's in serum bij type 2 meestal onder de 400  $\mu\text{mol/l}$ . In situaties waarin een verhoogde bloedafbraak optreedt, zoals bij trauma's of ontstekingen, kan ook bij type 2 patiënten het ongeconjugeerde bilirubine tot lethale hoogte stijgen. Bij type 2 patiënten kan het serum niveau verlaagd worden door behande-

ling met phenobarbital (27,28). Deze phenobarbital respons wordt in de praktijk gebruikt om beide types van elkaar te onderscheiden.

Naast deze twee zeldzame ernstige afwijkingen bestaat er een veel voorkomende erfelijke partiële bilirubine-UGT-deficiëntie, het syndroom van Gilbert (29). Bij patiënten met het syndroom van Gilbert is de bilirubine-UGT-activiteit gereduceerd tot 30 procent van normaal (30,31). Deze verlaagde glucuronidering leidt bij Gilbertpatiënten tot fluctuerende ongeconjugeerde hyperbilirubinemie waarbij het serumniveau meestal beneden de 100 µmol/l blijft. Uit populatie-studies is gebleken dat dit voor het syndroom van Gilbert karakteristieke verhoogde serum bilirubine-niveau bij 10% van de bevolking voorkomt (32,33). Hiermee is het onschadelijke syndroom van Gilbert de meest voorkomende erfelijke afwijking bij de mens. Omdat voor deze afwijking geen duidelijke diagnose bestaat, leiden de verhoogde serum bilirubine-niveaus vaak tot veel onnodige onderzoeken om andere oorzaken van de verhoging op te sporen of uit te sluiten.

### UGT1-mutaties bij Crigler-Najjar patiënten

In de mens komt bilirubine-UGT alleen in de lever tot expressie. Identificatie van mutaties bij Crigler-Najjar patiënten vanuit mRNA is daarom alleen mo-

gelijk door een leverbiopt te nemen. Identificatie van de mutaties in genomisch DNA maakt deze vervelende ingreep overbodig. Bovendien heeft dit het extra voordeel dat deze methode ook voor prenatale diagnostiek gebruikt kan worden. Met dit doel hebben wij het humane UGT1-gen geïsoleerd en hebben wij van alle bilirubine-UGT coderende exonen, UGT1A, UGT1.2 tot en met UGT1.5, de flankerende intron-sequentie bepaald (12). Met behulp van specifieke primers, gericht tegen deze intron-sequenties, kan nu vanuit genomisch DNA het gehele bilirubine-UGT-coderende deel door middel van de polymerase chain reaction geamplificeerd en gesequenced worden. Deze methode maakt het mogelijk om vanuit genomisch DNA, geïsoleerd uit 1 ml bloed, de mutaties in het UGT1-gen op te sporen. Inmiddels is op deze manier bij een aantal Crigler-Najjar patiënten de mutatie geïdentificeerd. De complexe structuur van het UGT1-gen maakt dat de locatie van de mutatie bepaalt of één of meerdere enzymen gemuteerd zullen zijn. Dit is de verklaring voor de heterogeniteit in UGT-activiteit bij Crigler-Najjar type 1 patiënten (34). De mutaties in het UGT1-gen bij deze patiënten zijn inmiddels geïdentificeerd (12,35,36). De mutaties bij de patiënten die deficiënt waren voor meerdere UGT1-enzymen waren gelokaliseerd in het gemeenschappelijke carboxy-einde. Mutaties in dit deel,

**Tabel 1.** Mutaties in Crigler-Najjar type 1 patiënten

Exon	mutatie DNA	mutatie eiwit	activiteit	refer.
1A	nt 508/510 del.	AA 170 phe del.	inact.	36
1A	nt 529 T -> C	AA 177 Cys->Arg	inact.	36
1A	nt 826 G -> T	AA 276 Gly->Arg	inact.	36
1A	nt 840 C -> A	AA 280 Cys->stop	inact.	47
2	nt 875 C -> T	AA 292 Ala->Val	N.B.	47
2	nt 879/892 del.	frameshift	inact.	36
2	nt 923 G -> A	AA 308 Gly->Glu	N.B.	47
2	nt 926 G -> A	AA 309 Gly->Glu	inact.	48
2	nt 973 deletie	frameshift	inact.	36
2	nt 991 C -> T	AA 331 Gln->stop	inact.	35
3	nt 1005 G -> A	AA 335 Trp->stop	inact.	47
3	nt 1021 C -> T	AA 341 Arg->stop	inact.	49
3	nt 1069 C -> T	AA 357 Gln->stop	inact.	12
3	nt 1070 A -> G	AA 357 Gln->Arg	N.B.	47
4	nt 1102 G -> A	AA 368 Ala->Thr	N.B.	47
4	nt 1124 C -> T	AA 375 Ser->Phe	inact.	12,36
4	nt 1143 C -> G	AA 381 Ser->Arg	N.B.	47
4	nt 1201 G -> C	AA 401 Ala->Pro	N.B.	47
4	1nt ins. nt 1224	frameshift	inact.	47
4	nt 1282 A -> G	AA 428 Lys->Glu	N.B.	47
5	nt 1309 A -> T	AA 437 Lys->stop	inact.	47

N.B: niet bepaald

**Tabel 2.** Mutaties in Crigler-Najjar type 2 patiënten

Exon	mutatie DNA	mutatie eiwit	activiteit	refer.
1A	nt 211 G -> A	AA 71 Gly->Arg	N.B	50
1A	nt 524 T -> A	AA 175 Leu->Gln	partieel	36
1A	nt 625 T -> C	AA 209 Arg->Tryp	partieel	51,36
2	nt 992 A -> G	AA 331 Gln->Arg	N.B	52
5	nt 1456T -> G	AA 446 Tyr->Asp	N.B	50

N.B: niet bepaald

exonen 2 tot en met 5, komen voor in alle door het UGT1 gecodeerde mRNA's waardoor alle van dit gen afkomstige enzymen geïnactiveerd zullen zijn. Inmiddels bleek de mutatie bij een aantal Crigler-Najjar type 1 patiënten aanwezig in exon 1A van het UGT1-gen (zie tabel 1). Bij deze patiënten is alleen B-UGT1 geïnactiveerd, alle andere door het UGT1-gen gecodeerde enzymen zijn normaal aanwezig. Bij deze patiënten is bijvoorbeeld de glucuronidering van fenolachtige substraten normaal. Ook B-UGT2 is bij deze patiënten normaal aanwezig. Dat desondanks de glucuronidering van bilirubine bij deze patiënten helemaal afwezig is, geeft aan dat B-UGT1 de enige bilirubine-UGT bij de mens is.

### **Verschil Crigler-Najjar type 1 en type 2**

Bij Crigler-Najjar type 1 patiënten is de glucuronidering van bilirubine helemaal afwezig, terwijl bij type 2 patiënten nog een zekere rest-activiteit aanwezig is. De mutaties in het UGT1-gen bij type 1 patiënten zullen resulteren in een totale inactivatie van het enzym. Mutaties als inserties en deleties, die een frameshift veroorzaken zullen resulteren in een verkort enzym of in een foutieve vertaling van het mRNA naar eiwit. Ook mutaties die een prematuur stopcodon introduceren resulteren in de synthese van een verkort enzym. Tenslotte kan een mutatie in de intron-exonovergang een "splice-site" veranderen en leiden tot een gehele of partiële deletie van dit exon uit het uiteindelijke mRNA. Al dit soort mutaties leiden tot een totale inactivatie van het enzym. Wanneer bij een patiënt in beide UGT1-allelen een dergelijke mutatie aanwezig is, zal deze geen B-UGT-activiteit hebben en dus een Crigler-Najjar type 1 zijn. In dergelijke gevallen zijn de sequence-gegevens voldoende voor het stellen van een diagnose.

Bij missense mutaties is slechts één aminozuur veranderd. Het effect van een dergelijk mutatie op de enzymactiviteit is afhankelijk van de mate waarin beide aminozuren van elkaar verschillen en hoe essentieel het gemuteerde aminozuur is voor de functie van het enzym. Sequentie-gegevens alleen zijn niet voldoende om het effect van missense mutaties op de enzymactiviteit te kunnen voorspellen. Het effect van dergelijk mutaties kan alleen bepaald worden door het gemuteerde enzym tot expressie te brengen en de activiteit te meten. Dit hebben wij voor een aantal mutaties gedaan (36). De activiteit van het gemuteerde enzym hebben we vergeleken met die van normaal B-UGT. Inbouw van verschillende bij type 1 patiënten gevonden missense mutaties resulteerde in de complete inactivatie van het enzym. Daarentegen resulteerde inbouw van type 2 mutaties in een slechts gedeeltelijke inactivatie van B-UGT1. De bilirubine-glucuroniderende restactiviteit bij deze type 2 patiënten is dus afkomstig van een partiële inactivatie van B-UGT1.

### **Diagnostiek type 1 en type 2**

Bij Crigler-Najjar type 2 patiënten daalt het bilirubine in serum met meer dan 25% na phenobarbital behandeling, terwijl bij type 1 patiënten geen of slechts een kleine verlaging optreedt. Dit verschil in phenobarbitalrespons wordt gebruikt om beide types Crigler-

Najjar syndroom van elkaar te kunnen onderscheiden. Bij twee door ons onderzochte type 2 patiënten bleek het gemuteerde bilirubine-UGT nog partiëel actief (36). Van deze twee reageerde alleen patiënt A op phenobarbital. Patiënt B reageerde hier niet op en zou op basis hiervan dus een Crigler-Najjar type 1 patiënt zijn. Echter, uit de expressie-proeven van het gemuteerde B-UGT 1 en uit de aanwezigheid van bilirubine-glucuronides in de gal blijkt dat deze patiënt bilirubine-UGT activiteit heeft. De patiënt wordt behandeld met slechts 4 uur lichttherapie wat voldoende is om het serum bilirubine niveau beneden de 130  $\mu\text{mol/l}$  te houden. De aanwezigheid van bilirubine-UGT-activiteit betekent dat het toch een Crigler-Najjar type 2 patiënt is. Het ontbreken van de phenobarbitalrepons bij deze type 2 patiënt geeft aan dat diagnostiek op basis van deze respons niet altijd betrouwbaar is. Een probleem hierbij is dat nog niet duidelijk is hoe phenobarbital tot een verlaging van het serum bilirubine leidt. Sommige auteurs rapporteren een verhoogde expressie van B-UGT1 (37), anderen vinden een inductie van B-UGT2 (5). Echter, phenobarbital verlaagt ook het serum bilirubine in de Gunn rat met 36% (38). Deze rat heeft geen bilirubine-transferase-activiteit en is een goed diermodel voor Crigler-Najjar type 1 (39). De mutatie in het UGT1-gen bij de Gunn rat is een deletie in exon 4. Deze deletie veroorzaakt een frameshift waardoor alle door het UGT1 gecodeerde enzymen inactief zijn. Dus bij de Gunn rat is inductie van bilirubine-UGT-activiteit niet mogelijk. De verlaging door phenobarbital bij de Gunn rat verloopt dus via een B-UGT onafhankelijk mechanisme, mogelijk via een verschuiving van de pool ongeconjugeerde bilirubine vanuit het bloed naar de lever. Dat phenobarbital effectief is in de Gunn rat geeft duidelijk aan dat voor de diagnostiek de phenobarbital respons niet echt betrouwbaar is. Expressie van het gemuteerde bilirubine-UGT is een betere methode om de mate van bilirubine-UGT-deficiëntie te bepalen. Een belangrijk nadeel van deze methode is dat deze erg bewerkelijk en dus erg duur is. Een ander mogelijk betrouwbaar alternatief is gal-analyse met HPLC (40). Echter, hiervoor is een endoscopische retrograde cholangiopancreatografie (ERCP) nodig. Omdat dit een onprettige ingreep is zal voorlopig phenobarbital nog wel voor de diagnostiek gebruikt blijven worden.

### **Het syndroom van Gilbert**

Milde fluctuerende hyperbilirubinemie komt bij 5 tot 10 procent van de bevolking voor (32,33). Hoewel sommige Gilbert patiënten drager zijn van het Crigler-Najjar syndroom, heeft deze vorm van erfelijke hyperbilirubinemie in de meeste gevallen een andere oorzaak. Immers, op basis van het aantal Crigler-Najjar patiënten is te berekenen dat slechts 1 op de 500 personen drager voor deze zeldzame afwijking is. Bovendien zijn niet alle dragers van Crigler-Najjar syndroom Gilbert patiënt maar is het serum bilirubine-niveau bij veel dragers normaal (16). Dus naast een klein aantal Gilbert patiënten die drager zijn van het Crigler-Najjar syndroom is er een grote groep waarbij de bilirubine glucuronidering door een an-

dere oorzaak verlaagd is. Om deze oorzaak op te sporen, hebben wij het B-UGT-gen bij 10 niet gerelateerde Gilbert patiënten onderzocht. Het coderende deel van dit gen bleek normaal bij deze patiënten (41). Dit betekent dat de verlaagde bilirubine-UGT-activiteit bij het syndroom van Gilbert niet veroorzaakt wordt door een veel voorkomende mutatie die tot een partiële inactivatie van dit enzym leidt. In plaats hiervan bleken alle 10 Gilbert patiënten homozygoot voor een afwijkend TATAA-element in het promotergebied van B-UGT. Dit TATAA-element, de bindingsplaats van de transcriptie-factor TF2D, speelt in veel eukaryote promoters een essentiële rol (42-44). Het effect van de gevonden afwijking in de TATAA-box op de expressie van het B-UGT-gen is bepaald door het promotergebied met de normale- en met de afwijkende TATAA-box voor een reporter gen te plaatsen. Beide constructen zijn getransfecteerd in een humane hepatoma cellijn, waarna de expressie van het reporter gen gemeten werd. De expressie van het reporter gen geplaatst achter de afwijkende TATAA-box bleek 3 tot 6 maal lager (41). Hieruit blijkt dat de verlaagde bilirubine glucuronosyltransferase-activiteit bij Gilbert patiënten veroorzaakt wordt door een lagere expressie van het B-UGT-gen. De frequentie van het allel met dit afwijkende TATAA-element in de bevolking is 40%. Dit betekent dat 16 % van de bevolking homozygoot voor deze afwijking is en dus een verlaagde B-UGT-expressie heeft. Hoewel het gemiddelde serum bilirubine-niveau bij mensen die homozygoot zijn voor de afwijkende TATAA-box hoger is, hebben ze niet allemaal het syndroom van Gilbert. Naast de verlaagde glucuronidering van bilirubine is een extra factor nodig voor de volledige expressie van het Gilbertsyndroom. Een verhoogde aanvoer van bilirubine is zo'n additionele factor die samen met een verlaagde glucuronidering tot Gilbertsyndroom zal leiden. De verkorte levensduur van de rode bloedcellen die bij 50% van de Gilbertpatiënten voorkomt geeft aan dat de verhoogde bilirubine aanvoer bij deze afwijking veel voorkomt (45). Ook het feit dat de meeste Gilbertpatiënten mannen zijn, die een hogere bilirubine-aanvoer hebben door het grotere aantal rode bloedcellen per kg lichaamsgewicht, wijst op het belang van de bilirubine-productie.

### Gentherapie

Nu de diagnostiek voor erfelijke afwijkingen van de bilirubine-glucuronidering afgerond is zal verder onderzoek zich richten op de ontwikkeling van een betere therapie. Zoals gemeld is levertransplantatie op dit moment de enige afdoende behandeling voor Crigler-Najjar type 1. Echter na deze zware ingreep blijft de patiënt afhankelijk van medicijnen. Gentherapie zou mogelijk een goed alternatief kunnen zijn. Met de nu bekende technieken is de introductie van genen in de lever, op een manier die tot een hoge stabiele expressie leidt, nog niet mogelijk. Recent is er bij een patiënt, die deficiënt was voor de LDL receptor, gentherapie gebruikt om deze receptor in de lever tot expressie te brengen. Hoewel hiermee expressie in de lever verkregen werd was deze veel te laag om effect te hebben. Het Crigler-Najjar syndroom is van

wege de beschikbaarheid van een goed diermodel een kandidaat voor de ontwikkeling van levergerichte gentherapie, maar ook voor deze afwijking is toepassing hiervan bij de patiënt de komende jaren nog niet aan de orde.

### Literatuur

1. Dutton GJ. Glucuronidation of Drugs and Other Compounds. 1980; CRC Press, Boca Raton, Florida.
2. Jansen PLM, Mulder GJ, Burchell B, Bock KW. New Developments in glucuronidation research: report of a workshop on "Glucuronidation its role in health and disease". *Hepatology* 1991; 15: 532-544.
3. Burchell B, Nebert DW, Nelson DR, Bock KW, Iyanagi T, Jansen PLM, Lancet D et al. The UDP Glucuronosyltransferase Gene Superfamilie: Suggested Nomenclature Based on Evolutionary Divergence. *DNA and Cell Biol* 1991; 10: 487-494.
4. Jackson MR, McCarthy LR, Harding D, Wilson S, Coughtrie MWH, Burchell B. Cloning of a human liver microsomal UDP-glucuronosyltransferase cDNA. *Biochem J* 1987; 242: 581-588.
5. Ritter JK, Sheen YY, Owens IS. Cloning and expression of human liver UDP-glucuronosyltransferase in COS-1 cells. 3,4-Catechol estrogens and estrilol as primary substrates. *J Biol Chem* 1990; 265: 7900-7906.
6. Coffman BL, Telphy TR, Irshaid YM, Green MD, Smith C, Jackson MR, Wooster R et al. Characterization and primary sequence of a human hepatic microsomal estrilol UDP glucuronosyltransferase. *Arch Biochem Biophys* 1990; 281: 170-175.
7. Mackenzie PI. Rat liver UDP-glucuronosyltransferase. cDNA sequence and expression of a form glucuronidating 3-hydroxyandrogens. *J Biol Chem* 1986; 261: 14112-14117.
8. Mackenzie PI. Rat liver UDP-glucuronosyltransferase. Identification of cDNAs encoding two enzymes which glucuronidate testosterone, dihydrotestosterone, and B-estradiol. *J Biol Chem* 1987; 262: 9744-9749.
9. Jackson MR, Burchell B. The full length coding sequence of rat liver androsterone UDP-glucuronosyltransferase cDNA and comparison with other members of this gene family. *Nucleic Acids Res* 1986; 14: 779-795.
10. Ritter JK, Crawford JM, Owens IS. Cloning of two human liver bilirubin UDP-glucuronosyltransferase cDNA's with expression in COS-1 cells. *J Biol Chem* 1991; 266: 1043-1047.
11. Ritter JK, Chen F, Sheen YY, Tran HM, Kimura S, Yeatman MT, Owens IS. A novel complex locus UGT1 encodes human bilirubin, phenol, and other UDP-glucuronosyltransferase isozymes with identical carboxyl termini. *J Biol Chem* 1992; 267: 3257-3261.
12. Bosma PJ, Roy Chowdhury N, Goldhoorn B, Hofker MH, Oude Elferink RPJ, Jansen PLM, Roy Chowdhury J. Sequence of Exons and the flanking regions of human bilirubin-UDP-glucuronosyltransferase gene complex and identification of a genetic mutation in a patient with Crigler-Najjar syndrome type1. *Hepatology* 1992; 15: 941-947.
13. Owens IS, Ritter JK. The novel bilirubin/phenol UDP-glucuronosyltransferase UGT1 gene locus: implications for multiple nonhemolytic familial hyperbilirubinemia phenotypes. *Pharmacogenetics* 1992; 2: 93-108.
14. Mackenzie PI. Expression of chimeric cDNAs in cell culture defines a region of UDP-glucuronosyltransferase involved in substrate selection. *J Biol Chem* 1990; 265: 3432-3435.
15. Jackson MR, Nilsson T, Peterson PA. Identification of a consensus motif for retention of transmembrane proteins in the endoplasmic reticulum. *EMBO J* 1990; 9: 3153-3162.

16. Bosma PJ, Seppen J, Goldhoorn B, Bakker C, Oude Elferink RPJ, Roy Chowdhury J, Roy Chowdhury N et al. Bilirubin UDP-glucuronosyltransferase 1 is the only relevant bilirubin glucuronidating isoform in man. *J Biol Chem* 1994; 269: 17960-17964.
17. Harding D, Fournel-Gigleux S, Jackson MR, Burchell B. Cloning and substrate specificity of a human phenol-UDP-glucuronosyltransferase expressed in COS-7 cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85: 8381-8385.
18. Wooster R, Sutherland L, Ebner T, Clarke D, Da Cruz E Silva O, Burchell B. Cloning and stable expression of a new member of the human liver phenol/bilirubin: UDP-glucuronosyltransferase cDNA family. *Biochem J* 1991; 278: 465-469.
19. Bor M van de, Zeben-van der Aa TM van, Verloove-Van Horick SP, Brand R, Ruys JH. Hyperbilirubinemia in pre-term infants and neurodevelopment outcome at 2 years of age: Results of national collaborative survey. *Pediatrics* 1989; 83: 915-920.
20. Valaes TN, Harvey-Wilkes K. Pharmacologic approaches to the prevention and treatment of neonatal hyperbilirubinemia. *Clin Perinatol* 1990; 17: 245-273.
21. Crigler JF, Najjar VA. Congenital familial nonhemolytic jaundice with kernicterus. *Pediatrics* 1952; 10: 169-180.
22. Roy Chowdhury J, Lahiri P, Roy Chowdhury N. Inherited disorders of bilirubin metabolism. In: Emery AEH, Rimoin DL, eds. Principles and practice of medical genetics. 2nd ed. Edinburgh, UK: Churchill-Livingstone, 1990; 1135-1164.
23. Onishi S, Isobe K, Itoh S, Manabe M, Sasaki K, Fukuzaki, Yamakawa T. Metabolism of bilirubin and its photoisomers in newborn infants during phototherapy. *J Biochem* 1986; 100: 789-795.
24. Ennever JF, Costarino AT, Polin RA, Speck WT. Rapid clearance of a structural isomer of bilirubin during phototherapy. *J Clin Invest*. 1987; 79: 1674-1678.
25. Shevell MI, Bernard B, Adelson JW, Doody DP, Laberge JM, Guttman. Crigler-Najjar syndrome type 1: treatment by home phototherapy followed by orthotopic hepatic transplantation. *J Pediatr* 1987; 110: 429-431.
26. Kaufman SS, Wood RP, Shaw BW, Markin RS, Rosenthal P, Gridelli B, Vanderhoof JA. Orthotopic liver transplantation for type 1 Crigler-Najjar syndrome. *Hepatology* 1986; 6: 1259-1262.
27. Arias IM, Gartner LM, Cohen M, Ben Ezzer J, Levi AJ. Chronic non-hemolytic unconjugated hyperbilirubinemia with glucuronosyl transferase deficiency: clinical, biochemical, pharmacologic, and genetic evidence for heterogeneity. *Am J Med* 1969; 47: 395-409.
28. Yaffe SJ, Levy G, Matsuzawa T, Baliah T. Enhancement of glucuronide-conjugating capacity in a hyperbilirubinemic infant due to apparent enzyme induction by phenobarbital. *N Eng J Med* 1966; 275: 1461-1466.
29. Gilbert A, Lereboullet P. La Cholemie simple familiale. *Semaine Medicale* 1901; 21: 241-243.
30. Arias IM, London IM. Bilirubin glucuronide formation in vitro: demonstration of a defect in Gilbert's disease. *Science* 1957; 126: 563-564.
31. Black M, Billing BH. Hepatic bilirubin UDP-glucuronosyltransferase activity in liver disease and Gilbert's syndrome. *New Eng J Med* 1969; 280: 1266-1271.
32. Owens P, Evans J. Population studies on Gilbert's syndrome. *J Med Genet* 1975; 12: 152-156
33. Sieg A., Arab L. Schlierf G, Stiehl A, Kommerell B. Die Prävalenz des Gilbert Syndroms in Deutschland. *Dtsch med Wschr* 1987; 112: 1206-1208.
34. ES HHG van, Goldhoorn BG, Paul-Abrahamse M, Oude Elferink RPJ, Jansen PLM. Immunochemical analysis of uridine diphosphate-glucuronosyltransferases in four patients with Crigler-Najjar syndrome type 1. *J Clin Invest* 1990; 85: 1199-1205.
35. Bosma PJ, Roy Chowdhury J, Huang TJ, Lahiri RPJ, Oude Elferink RPJ, van Es HHG, Lederstein M, et al. Mechanisms of inherited deficiencies of multiple UDP-glucuronosyltransferase isoforms in two patients with Crigler-Najjar syndrome type 1. *FASEB J* 1992; 6: 2859-2863.
36. Seppen J, Bosma PJ, Goldhoorn BG, Bakker CTM, Roy Chowdhury J, Roy Chowdhury J, Jansen PLM, et al. Discrimination between Crigler-Najjar type 1 and 2 by expression of mutant bilirubin uridine diphosphate-glucuronosyltransferase. *J Clin Invest* 1994; 94: 2385-2391.
37. Sutherland L, Ebner T, Burchell B. The expression of UDP-glucuronosyltransferases of the UGT1 family in human liver and kidney and in response to drugs. *Biochem Pharmacol* 1993; 45: 295-301.
38. Cohen AN, Kapitulnik J, Ostrow JD, Zenone EA, Cocrane C, Celic L, Cheney H. Effects of phenobarbital on bilirubin metabolism and its response to phototherapy in the jaundiced Gunn rat. *Hepatology* 1985; 5: 310-316.
39. Iyanagi T. Molecular basis of multiple UDP-glucuronosyltransferase isoenzyme deficiencies in the hyperbilirubinemic rat (Gunn rat). *J Biol Chem* 1991; 266: 24048-24052.
40. Sinaasappel M, Jansen PLM. The differential diagnosis of Crigler-Najjar disease, types 1 and 2, by bile pigment analysis. *Gastroenterology* 1991; 100: 783-789.
41. Bosma PJ, Roy Chowdhury J, Bakker C, Gantla S, de Boer A, Oostra BA, Lindhout D, Tytgat GNJ, Jansen PLM, Oude Elferink RPJ, Roy Chowdhury N. The genetic basis of the reduced expression of bilirubin UDP-glucuronosyltransferase 1 in Gilbert's syndrome. *New Eng J Med* 1995 (in press).
42. Maniatis T, Goodbourn S, Fisher JA. Regulation of inducible and tissue-specific gene expression. *Science* 1987; 236: 1237-1244.
43. Saltzman AG, Weinmann R. Promoter specificity and modulation of RNA polymerase 2 transcription. *FASEB J* 1989; 3: 1723.
44. Greenblatt J. Roles of TF2D in transcriptional initiation by RNA polymerase 2. *Cell* 1991; 66: 1067-1070.
45. Berk PD, Blaschke TF. Detection of Gilbert syndrome in patients with hemolysis: a method using radioactive chromium. *Ann Intern Med* 1972; 77: 527-531.
46. Aono S, Yamada Y, Keino H, Sasaoka Y, Nakagawa T, Yazawa T, Mimura S, et al. A new type of defect in the gene for bilirubin uridine 5'-diphosphate-glucuronosyltransferase in a patient with Crigler-Najjar type 1. *Pediatric Res* 1994; 35: 629-632.
47. Labrune P, Myara A, Hadchouel M, Bernard O, Trivin F, Roy Chowdhury N, Roy Chowdhury J, et al. Genetic heterogeneity of Crigler-Najjar syndrome type 1: a study of 14 cases. *Human Genet* 1994; 94: 693-697.
48. Erps LT, Ritter JK, Hersh JH, Blossom D, Martin NC, Owens IS. Identification of two single base substitutions in the UGT1 gene locus which abolish bilirubin uridine diphosphate glucuronosyltransferase activity in vitro. *J Clin Invest* 1994; 93: 564-570.
49. Moghrabi N, Clarke DJ, Burchell B, Boxer M. Cosegregation of intragenic markers with a novel mutation that causes Crigler-Najjar syndrome type 1: implication in carrier detection and prenatal diagnosis. *Am J Hum Genet* 1993; 53: 722-729.
50. Aono S, Yamada Y, Keino H, Hanada N, Nakagawa T, Sasaoka Y, Yazawa T, et al. Identification of a defect in the gene for bilirubin UDP-glucuronosyltransferase in a patient with Crigler-Najjar syndrome type 2. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; 197: 1239-1244.
51. Bosma PJ, Goldhoorn B, Oude Elferink RPJ, Sinaasappel M, Oostra BA, Jansen PLM. A mutation in bilirubin uridine 5'-diphosphate glucuronosyltransferase isoform 1 causing Crigler-Najjar type 2. *Gastroenterology* 1993; 105: 216-220.
52. Moghrabi N, Clarke DJ, Boxer M, Burchell B. Identification of an A-to-G missense mutation in exon 2 of the UGT1 gene complex that causes Crigler-Najjar syndrome type 2. *Genomics* 1993; 18: 171-173.

## Summary

*Clarification of the genetic background of inherited hyperbilirubinemia. Bosma P.J, Bakker CTM and Hoek F.J. Ned Tijdschr Klin Chem 1996; 21: 11-17.*

The uridine-diphosphate-glucuronosyltransferase (UGT) catalysed glucuronidation is an essential step in the excretion and detoxification of a large number of endogenous and exogenous compounds. These hydrophobic substrates are converted to hydrophylic conjugates by covalent binding to UDP-glucuronic acid (UDPGA). The UGT's are a multi gene family of membrane bound enzymes located in the endoplasmic reticulum (ER). The glucuronidation of bilirubin is physiologically very important, due to the large amount of this compound produced daily and its toxicity. Deficient bilirubin glucuronidation leads to high, toxic levels of unconjugated bilirubin, as is seen in the Crigler-Najjar syndrome. In man only UGT has activity towards bilirubin, while most other substrates are conjugated by several transferases. The bilirubin UDP-glucurono-

sytransferase (B-UGT) is encoded by the UGT1 gene. In addition to B-UGT this gene encodes several other transferases recognizing other substrates. These UGT's each have a unique aminotermus, containing the substrate bindings site, and a shared carboxy terminus, encoding the UDPGA bindings site and membrane insertion region. Since the isolation of the gene a number of mutations in Crigler Najjar patients have been identified. Recently, also the genetic background of Gilbert's syndrome, a mild form of inherited hyperbilirubinemia, was elucidated. This common inherited disorder is caused by an abnormality in the promoter region of B-UGT. Due to the presence of an additional TA in the TATAA box upstream of B-UGT1, the expression of this gene was only 20% of normal. This reduced expression of B-UGT is a prerequisite for Gilbert's syndrome but in addition other factors, like an increased bilirubin load, are required for its clinical presentation.

*Key-words: bilirubin; glucuronosyltransferase; mutation analysis; Crigler-Najjar; Gilbert's syndrome.*

Ned Tijdschr Klin Chem 1996: 21: 17-22

## Autonome expressie van progestageenreceptoren in humane meningeomen: na vele jaren nog steeds een uitdaging

M.A. BLANKENSTEIN<sup>1</sup>, S.G.A. KOEHORST<sup>1,4</sup>, C.J.H. van der KALLEN<sup>1</sup>, H.M. JACOBS<sup>1</sup>, A.B. van SPRIEL<sup>1</sup>, G.H. DONKER<sup>1</sup>, J.W. van't VERLAAT<sup>2</sup>, G. BLAAUW<sup>3</sup> en J.H.H. THIJSSSEN<sup>1</sup>

Meningeomen brengen op een oestrogeen-onafhankelijke wijze progestageenreceptoren (PR) tot expressie. Oestrogeenreceptoren (ER) zijn niet of nauwelijks aantoonbaar. De PR worden als functioneel actief aangemerkt, aangezien anti-progestagenen de groei-snelheid van gekweekte meningeoomcellen kunnen remmen en patiënten baat kunnen hebben bij behandeling met antiprogestagenen. In dit overzicht wordt het reeds vele jaren lopende onderzoek beschreven dat tot doel heeft het ER-negatieve/PR positieve fenotype van meningeomen te verklaren. Een eiwit dat in staat is aan het z.g. oestrogen responsive element (ERE) te binden werd met een band shift assay aangetoond. Voorts werden m.b.v. reverse transcriptase PCR mRNA's coderend voor diverse aberrante oestrogeenreceptoren geïdentificeerd. Tevens werd mRNA coderend voor de wild type ER aangetoond. Van de gevonden ER mutanten is er één dominant negatief (ERD7) en één inactief (ERD4), terwijl er één (ERD5) oestrogeen onafhankelijke transcriptieactiviteit heeft. Verder onderzoek is erop gericht te ontdek-

ken of het ERE-bindend eiwit door ERD5 wordt gecodeerd. Activering van andere signaaltransductiepathways, waarvan inmiddels een rol bij de PR synthese is gepostuleerd, leidde in meningeoomcellen niet tot verhoging van de PR concentratie. Dit zal leiden tot studies naar het promotor gebied van het PR gen.

*Trefwoorden: steroidreceptoren, meningeomen, oestrogenen, progestagenen*

Meningeomen zijn tumoren van de arachnoidale cellen van de hersenvliezen waarvan de meerderheid als histologisch benigne wordt geklassificeerd. Compressie van de hersenen maakt ze echter, afhankelijk van de locatie, potentiëel levensbedreigend. De primaire behandeling van meningeomen is chirurgisch, hetgeen in 68-80% van de gevallen curatief kan zijn. Meningeomen zijn relatief ongevoelig voor radio- en chemotherapie. Hoewel een adequate therapie voor recidiverende tumoren niet voorhanden is, kunnen patiënten langdurig overleven (1).

Meningeomen kunnen tot de potentiëel hormoongevoelige tumoren worden gerekend onder andere op grond van de epidemiologische waarnemingen dat de incidentie van meningeomen bij vrouwen ca. 3 maal zo hoog is als bij mannen (2) en de reversibele intensivering van symptomen tijdens zwangerschap en in de luteale fase van de menstruele cyclus (3).

In humane meningeomen komen progestageenreceptoren (PR) in hoge concentratie voor, terwijl oestrogeenreceptoren (ER) veelal niet of nauwelijks aantoonbaar zijn. In de zogenaamde "klassieke" doelwitweefsels

*Afdelingen Endocrinologie<sup>1</sup> en Neurochirurgie<sup>2</sup>, Academisch Ziekenhuis Utrecht; Afdeling Neurochirurgie De Wever Ziekenhuis, Heerlen<sup>3</sup>; Afdeling Klinische Chemie, Stichting Deventer Ziekenhuizen, Deventer<sup>4</sup>*

Naar een voordracht voor de Werkgemeenschap Klinische Chemie i.o., januari 1995

Correspondentie: Dr. M.A. Blankenstein, Afdeling Endocrinologie, Academisch Ziekenhuis Utrecht G02.626, Postbus 85500; 3508 GA Utrecht.  
Ingekomen: 26.07.95